



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

# Übersetzung der europäischen Patentschrift

①7 EP 0 637 314 B 1

①0 DE 693 19 336 T 2

①1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 H 19/04**  
C 07 H 21/00

(3)

- |    |   |                |
|----|---|----------------|
| ②1 | Deutsches Aktenzeichen:                               | 693 19 336.0   |
| ②6 | PCT-Aktenzeichen:                                     | PCT/US93/03337 |
| ②6 | Europäisches Aktenzeichen:                            | 93 909 499.1   |
| ②7 | PCT-Veröffentlichungs-Nr.:                            | WO 93/22326    |
| ②6 | PCT-Anmeldetag:                                       | 9. 4. 93       |
| ②7 | Veröffentlichungstag<br>der PCT-Anmeldung:            | 11. 11. 93     |
| ②7 | Erstveröffentlichung durch das EPA:                   | 8. 2. 95       |
| ②7 | Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA: | 24. 6. 98      |
| ④7 | Veröffentlichungstag im Patentblatt:                  | 26. 11. 98     |

- ③0 Unionspriorität:  
873330                      24. 04. 92    US
- ⑦3 Patentinhaber:  
Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., US
- ⑦4 Vertreter:  
G. Koch und Kollegen, 80339 München
- ⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
DE, FR, GB

- ⑦2 Erfinder:  
REDDY, Parameswara, Meda, Brea, CA 92621, US;  
HANNA, Naeem, Botros, Fullerton, CA 92635, US

⑤4 N-ACYLIERTE 2'-DEOXYCYTIDINE FÜR DIE OLIGONUKLEOTID SYNTHESE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 19 336 T 2

DE 693 19 336 T 2

EP 0 637 314

93 909 499.1

5

Verwandte Anmeldung

Diese Anmeldung ist mit der EP-A-0639200 mit dem Titel 'Methods  
an Reagents for Cleaving and Deprotecting Oligonucleotides' von  
10 Parameswara Meda Reddy und Naeem Botros Hanna verwandt.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf die  
Synthese von Nukleinsäuren und insbesondere auf Schutzgruppen,  
die bei der Synthese von Nukleinsäuren nützlich sind.

15

Ausgangspunkt der Erfindung

Desoxyribonukleinsäure ('DNA') und Ribonukleinsäure ('RNA')  
20 sind lange, fadenförmige Makromoleküle, wobei DNA eine Kette  
von Desoxyribonukleotiden umfaßt, und RNA eine Kette von  
Ribonukleotiden umfaßt. Ein Nukleotid besteht aus einem  
Nukleosid und einer oder mehreren Phosphatgruppen; ein Nukleo-  
sid besteht aus einer Stickstoffbase, die mit einem Pentose-  
25 zucker verbunden ist. Die Phosphatgruppe ist typischerweise an  
der Hydroxylgruppe ('OH') des fünften Kohlenstoffatoms ('C5')  
des Pentosezuckers angebracht; sie kann jedoch auch an der  
Hydroxylgruppe des dritten Kohlenstoffatoms ('C3-OH') angebracht  
sein. In einem DNA-Molekül ist der Pentosezucker Desoxyribose,  
30 während in einem RNA-Molekül der Pentosezucker Ribose ist.  
Die DNA-Stickstoffbasen sind Adenin ('A'), Cytosin ('C'),  
Guanin ('G') und Thymin ('T'). Für RNA sind diese Basen die-  
selben, außer daß Urazil ('U') Thymin ersetzt. Folglich  
sind die Hauptnukleoside der DNA, gemeinsam als 'Desoxynukleo-  
35 side' bezeichnet, wie folgt: Desoxyadenosin ('dA');  
Desoxycytidin ('dC'); Desoxyguanosin ('dG'); und Thymidin ('T').  
Die entsprechenden Ribonukleoside werden als 'A'; 'C'; 'G'; und  
'U' bezeichnet. (Konventionsgemäß und weil es kein entsprechen-

des Thymidinribonukleosid gibt, wird Desoxythymidin typischerweise als 'T' bezeichnet; aus Gründen der Einheitlichkeit jedoch wird Thymidin in dieser Beschreibung als 'dT' bezeichnet.

5 Die Sequenz der Stickstoffbasen des DNA- und RNA-Moleküls kodiert die genetische Information, die in dem Molekül enthalten ist. Die Zucker- und Phosphatgruppen eines DNA- oder RNA-Moleküls spielen eine strukturelle Rolle, indem sie das Rückgrat bzw. Gerüst des Moleküls bilden. Insbesondere der Zuckeranteil  
10 jedes Nukleotids ist mit dem Zuckeranteil des angrenzenden Nukleotids derartig verbunden, daß das 3'-Hydroxyl des Pentosezuckers eines Nukleotids mit dem 5'-Hydroxyl des Pentosezuckers des angrenzenden Nukleotids verbunden ist. Die Verbindung zwischen den zwei Pentosezuckern erfolgt typischerweise  
15 über eine Phosphordiester-Bindung. Basierend auf dieser Bindungsvorschrift hat ein Ende ('Terminus') der Nukleotidkette einen 5'-Terminus (z.B. Hydroxyl, Triphosphat, etc.), und das andere Ende eine 3'-Hydroxyl-Gruppe. Konventionsgemäß wird die Basensequenz einer Nukleotidkette in einer 5'- zu 3'-  
20 Richtung geschrieben, d.h., 5'-ATCG-3', oder, einfach ATCG.

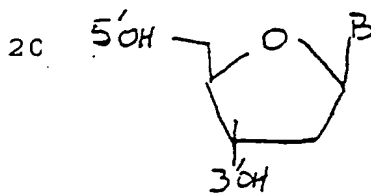
Obwohl DNA und RNA innerlich durch lebende Tiere produziert werden, kann DNA und RNA chemisch derartig synthetisiert werden, daß synthetische Stränge von DNA und RNA schnell und effektiv  
25 produziert werden können. Diese Stränge werden typischerweise als 'synthetische Oligonukleotide' oder 'Oligonukleotide' bezeichnet. Ein weit verbreitetes chemisches Verfahren für die Synthese von Oligonukleotiden wird als die 'Phosphoramidit- bzw. phosphoramidierte Methodik' bezeichnet. S. z.B. US-Patent-Nr.  
30 4415732; McBride, L. und Caruthers, M., Tetrahedron Letters, 24: 245-248 (1983); und Sinha, N. et al. Nucleic Acid Res; S. 17: 4539-4557 (1984). Im Handel erhältliche Oligonukleotid-Synthetisierer, auf Basis der Phosphoramidit-Methodik, schließen z.B. die Biosearch 8750™ und ABI 380B™,  
35 392™ und 394™ DNA-Synthetisierer ein.

Die Wichtigkeit von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden ist hauptsächlich durch die breite Vielzahl von Anwendungs-

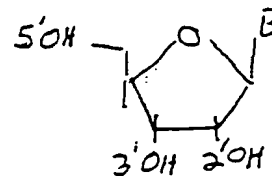
möglichkeiten begründet, bei denen Oligonukleotide verwendet werden können. Z.B. können Oligonukleotide in biologischen Studien verwendet werden, die Genmanipulation, DNA-Rekombinations-Verfahren, Antisense-DNA, Erfassung von genomischer DNA, 5 Proben-DNA und RNA von verschiedenen Systemen, Erfassung von Protein-DNA-Komplexen, Erfassung von lagegerichteter Mutagenese, Primern oder Startern für DNA- und RNA-Synthesen, Starter für Verstärkungs- bzw. Amplifikationsverfahren wie beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion, Ligase-Kettenreaktion, etc., 10 Matrizen, Linker, und Molekular-Wechselwirkungsstudien, einbeziehen.

Die Primärstrukturen von DNA- und RNA-Molekülen können wie folgt dargestellt werden:

15

DNA

25 B= Adenin, Thymin,  
Guanin, Cytosin

RNA

B1= Adenin, Urazil,  
Guanin, Cytosin

Der Schlüsselschritt bei der Nukleinsäuresynthese ist die spe-  
30 zielle und sequentielle Ausbildung von Zwischennukleotid-  
Phosphat-Verbindungen zwischen einer 5'-OH-Gruppe eines Nukleo-  
tids und einer 3'-OH-Gruppe eines anderen Nukleotids. Demgemäß  
wird in der typischen Nukleotidsynthese die Phosphatgruppe eines  
'ankommenden' Nukleotids mit der 5'-OH-Gruppe eines anderen  
35 Nukleotides verbunden (d.h. die 5'-OH-Gruppe ist 'phosphory-  
liert' oder 'phosphityliert'). Diese Gruppen müssen dazu in der  
Lage sein, an der Oligonukleotidsynthese aktiv teilzunehmen.  
Folglich werden die 5'-OH-Gruppen derartig modifiziert (typi-

scherweise mit einer Dimethoxytrityl-Gruppe ('DMT')), daß ein Forscher zwei derartige Nukleotide in eine Reaktionskammer einführen und die Bedingungen darin so anpassen kann, daß die zwei Nukleotide richtig verbunden werden; durch eine Reihe von 5 aufeinanderfolgenden derartigen Hinzufügungen, kann ein wachsendes Oligonukleotid, das eine definierte Sequenz aufweist, exakt erzeugt werden.

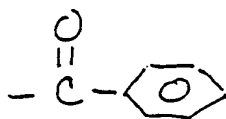
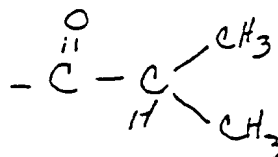
Die vier Basen der Nukleoside, Adenin, Thymin (Urazil im Falle 10 von RNA), Guanosin und Cytosin, schließen Anteile ein, die chemisch reaktiv sind (z.B. exozyklische Aminogruppen). Diese Gruppen müssen, anders als die 3'-OH- und 5'-OH-Gruppen, 'vorübergehend' geschützt werden, d.h. die Schutzgruppen müssen dazu in der Lage sein, irgendwelche reaktiven Stellen auf der 15 Base solange zu blockieren, bis die Oligonukleotidsynthese abgeschlossen ist; nachdem eine derartige Synthese abgeschlossen ist, müssen diese Gruppen auch dazu in der Lage sein, derartig von den Basen entfernt zu werden, daß die biologische Aktivität des Oligonukleotids nicht beeinflußt wird.

20

Der Hauptgrund für einen vorübergehenden Schutz der Base besteht darin, daß in der Abwesenheit derartiger Schutzgruppen die exozyklischen Aminogruppen ('NH<sub>2</sub>') der Basen um die Bindung an die 25 5'-OH-Gruppe konkurrieren können. Wenn eine derartige Reaktion stattfindet, wird das sich ergebende Produkt nicht brauchbar sein. Demgemäß sind diese Schutzgruppen bei der Verminderung des Auftretens von 'Nebenproduktbildung' wichtig, d.h. der Bildung von chemisch ähnlichen, aber unerwünschten Materialien. Cytidin 30 ist insbesondere während der Oligonukleotidspaltung und Schutzaufhebung für die Bildung von Nebenprodukten anfällig (d.h. die Verfahren, ein Oligonukleotid von einem festen Träger zu entfernen bzw. derartige Schutzgruppen zu entfernen). Die am weitesten verbreiteten Schutzgruppen, die in Verbindung mit der 35 Phosphoramidit-Methodik für Oligonukleotidsynthesen verwendet werden, sind Benzoyl für A und C, und Isobutyryl für G und C, (Thymin, das keine Aminogruppe aufweist, benötigt üblicherweise keine Schutzgruppe). Konventionsgemäß wird Benzoyl als 'bz'

bezeichnet, und Isobutyryl wird als 'ibu' derartig bezeichnet, daß die damit geschützten Desoxynukleoside typischerweise wie folgt bezeichnet werden: dA<sup>bz</sup>; dC<sup>bz</sup>; dCi<sup>bu</sup>; dG<sup>ibu</sup>.

5 Benzoyl und Isobutyryl haben die folgenden Strukturen:

bzibu

15 Diese Schutzgruppen können vorteilhafterweise vom Oligonukleotid mit Ammoniak entfernt werden (d.h., 'Schutzaufhebung').  
 Zusätzlich kann Ammoniak verwendet werden, um Oligonukleotide vom festen Trägermaterial zu entfernen, von dem aus sie synthetisiert wurden (d.h., 'Abspaltung'). Ammoniak kann vor-  
 20 teilhafterweise als ein Abspaltungs-/Schutzaufhebungsreagenz mit begrenzter Nebenproduktbildung verwendet werden.

Praktische Bedenken bestehen jedoch hinsichtlich der Verwendung von Ammoniak als ein Abspaltungs- und Schutz-  
 25 aufhebungsreagenz. Ammoniak benötigt eine (relativ) lange Zeitspanne, um das Abspaltungs- und Schutzaufhebungsverfahren abzuschließen. Im Durchschnitt werden sechs Minuten für die chemische Synthese jedes Nukleosids zu einem wachsenden Oligonukleotid benötigt; folglich kann man für ein durchschnittliches  
 30 Oligonukleotid von ungefähr 21 Nukleotiden (bezeichnet als ein '21-mer') davon ausgehen, daß die Synthese unter Verwendung im Handel erhältlicher DNA-Synthetisierer ungefähr 2 Stunden erfordern wird. Jedoch werden ungefähr 24 Stunden (Raumtemperatur) bis 6 Stunden (55°C) für die Abspaltung und Schutzauf-  
 35 hebung des Nukleotids unter Verwendung von Ammoniak benötigt. Es ist deutlich mehr Zeit für die letzten Schritte von Abspaltung und Schutzaufhebung als für die Synthese selbst erforderlich. Deshalb existierte ein ständiger Bedarf für

Abspaltungs- und Schutzaufhebungsreagenzien, die diese Schritte in ungefähr derselben Größenordnung wie die Synthese selbst abschließen können. Derartige Reagenzien werden in der oben erwähnten verwandten Anmeldung beschrieben.

5

Derartige Reagenzien umfassen allgemein zumindest ein geradket-  
tiges Alkylamin, das von 1 bis ungefähr 10 Kohlenstoffatomen  
umfaßt (ein derartiges Alkylamin kann wie folgt dargestellt  
werden:  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{0-10}\text{-CH}_3$ ). In einer besonders bevor-

10 zugten Ausführungsform des in der oben erwähnten Anmeldung be-  
schriebenen Reagenz, kann ein Reagenz, das Methylamin und T-  
Butylamin umfaßt, verwendet werden um Oligonukleotide in weniger  
als ungefähr 90 Minuten bei Raumtemperatur, und weniger als  
ungefähr 10 Minuten bei ungefähr 65°C abzuspalten und den  
15 Schutz aufzuheben.

Es wurde beobachtet, daß, wenn diese Reagenzien in Verbindung  
mit Oligonukleotiden verwendet wurden, die  $\text{dC}^{\text{ibu}}$  oder  $\text{dC}^{\text{bz}}$   
umfassen, die Bildung eines unerwünschten Nebenprodukts, N-  
20 Methylcytidin, auftreten könnte. In Bezug auf  $\text{dC}^{\text{bz}}$  waren  
ungefähr 10% der Cytidine von den Oligonukleotiden N-  
Methylcytidin. Folglich führte, während auf der einen Seite ein  
Abspaltungs-/Schutzaufhebungsreagenz entdeckt worden war, das  
diese Aufgaben schnell ausführen könnte, ein derartiges Reagenz  
25 auf der anderen Seite, wenn es in Verbindung mit den sogenannten  
'traditionellen' bz- und ibu-Schutzgruppen für die Base Cytidin  
verwendet wurde, zu Cytidin-Nebenproduktbildung.

Was erforderlich ist, sind bei der Oligonukleotidsynthese  
30 nützliche Schutzgruppen, die keine derartigen schädlichen  
Nebenwirkungen aufweisen.

Nach C.B. Reese et al, J. Chem. Soc. Perkin I 23, 2937 (1972)  
wurde festgestellt, daß, im Vergleich mit Ammoniak oder Dime-  
35 thylamin, Methylamin ein wirksameres Deacylierungsmittel bei der  
Deacylierung von N(2)-Acetyl-Guanosin darstellt. Aufgrund dieser  
Beobachtung wurde davon ausgegangen, daß es bei synthetischer  
Arbeit vorteilhaft sein sollte, Guaninreste durch N-Acetylie-

rung zu schützen und die Schutzgruppen durch Behandlung mit Methylamin in einem geeigneten Lösungsmittel, wie beispielsweise Ethanol, zu entfernen.

5

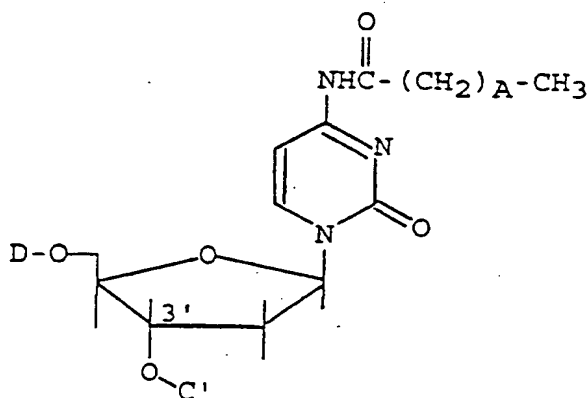
### Zusammenfassung der Erfindung

Diese Erfindung ergibt eine Verbindung, die die folgende Struktur aufweist:

10

15

20

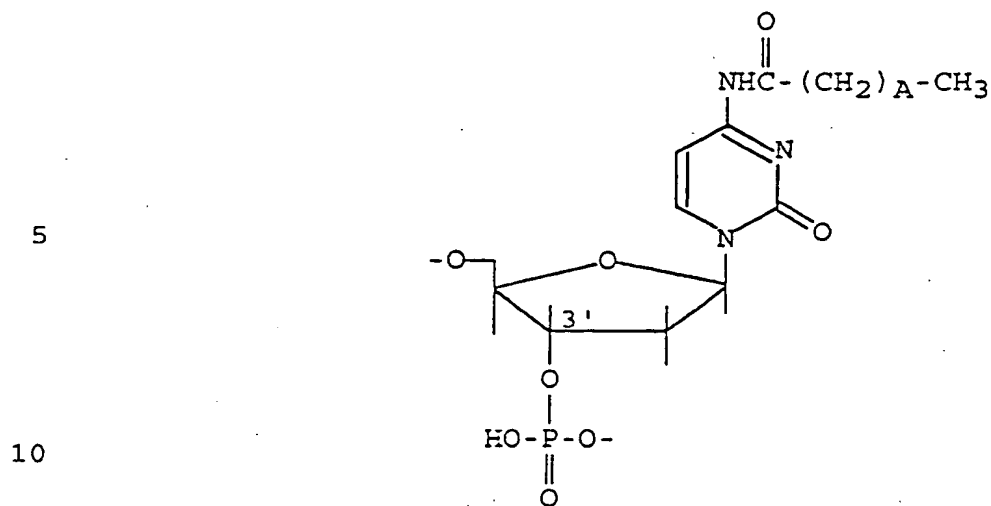


wobei A eine ganze Zahl zwischen 0 und 9 ist; C' eine Phosphor-  
 25 amidit-Funktionalität ist; und D Wasserstoff oder eine Schutz-  
 gruppe ist, die bei der Oligonukleotidsynthese verwendet wird.  
 Bevorzugt ist A eine ganze Zahl von 0 bis 5, bevorzugter 0 bis 2  
 und am meisten bevorzugt ist A 0. Die Erfindung stellt auch ein  
 Verfahren zur Schutzaufhebung eines DNA-Moleküls bereit, das die  
 30 Schritte umfaßt:

a) Bereitstellung eines Oligonukleotids, das zumindest  
 ein Nukleotid umfaßt, das die Formel aufweist:

35





wobei A eine ganze Zahl zwischen 0 und 9 ist; und

b) Inkontaktbringen der genannten Verbindung mit einer Lösung, die ein geradkettiges Alkylamin aufweist, um ein DNA-Molekül zu bilden, bei dem der Schutz aufgehoben ist.

Die beschriebenen Verbindungen verwenden Schutzgruppen, die zumindest ungefähr 30-mal instabiler als Benzoyl sind und eine Carbonylgruppe umfassen, die eine hieran befestigte geradkettige Alkylgruppe aufweist, wobei die Alkylgruppe von 1 bis 10 Kohlenstoffatome, bevorzugt von 1 bis 6 Kohlenstoffatome, bevorzugt von 1 bis 3 Kohlenstoffatome, und am meisten bevorzugt 1 Kohlenstoffatom umfaßt. Eine besonders bevorzugte Schutzgruppe ist Acetyl, das durch die folgende Formel dargestellt ist:



und hier als 'Ac' bezeichnet wird. Am meisten bevorzugt wird diese Schutzgruppe verwendet, um Cytidinbasen zu schützen; Acgeschütztes Desoxycytid wird hier als 'dc<sup>AC</sup>' bezeichnet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Es ist beabsichtigt, daß die folgenden Zeichnungen zum Zwecke der Veranschaulichung der ausführlichen Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen verwendet wird:

- Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der in den Beispielen I - IV beschriebenen chemischen Synthese;
- Fig. 2 ist eine photographische Wiedergabe einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Untersuchung von verschiedenen 35-, 51- und 101-mer, die verschiedene Prozentsätze von  $dC^{AC}$  und  $dC^{bz}$  umfassen, und entweder Methylamin-/T-Butylamin- oder Ammoniak-Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenzien ausgesetzt sind;
- Fig. 3 ist ein Elektropherogramm eines heterogenen 51-mer, das 35%  $dC^{bz}$  umfaßt, und Ammoniak als ein Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz ausgesetzt wurde;
- Fig. 4 ist ein Elektropherogramm eines heterogenen 51-mer, das 35%  $dC^{AC}$  umfaßt, und Methylamin/T-Butylamin als ein Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz ausgesetzt wurde;
- Fig. 5 ist eine photographische Wiedergabe einer PCR-abgeleiteten 957 Basenpaar-verstärkten Matrize;
- Fig. 6 ist eine photographische Wiedergabe einer Sequenzierungsreaktion der Matrize M13mp18;
- Fig. 7 ist ein Elektropherogramm einer 3'-terminalen Transferase-Verlängerung, die unter Verwendung eines 22-mer, das  $dC^{AC}$  umfaßt, begonnen wur-

de, und Methylamin/T-Butylamin als ein Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz ausgesetzt wurde; und

5 Fig. 8

ist ein Elektropherogramm einer 3'-terminalen Transferase-Verlängerung, die unter Verwendung eines 22-mer, das  $dc^{bz}$  umfaßt, begonnen wurde, und Ammoniak als einem Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz ausgesetzt wurde.

10

#### Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

15

Wie dem Fachmann bekannt ist, ist die Base Cytidin für Nebenproduktbildung während der Schutzaufhebung von Oligonukleotiden am anfälligsten. Folglich ist es, konventionsgemäß, nützlich, die Nebenproduktbildung von Cytidin während der Oligonukleotidsynthese und Schutzaufhebung zu überwachen. Im Laufe der Untersuchung von Abspaltungs-/Schutzaufhebungsreagenzien, die ein geradkettiges Alkylamin umfassen, das von zwischen 1 bis ungefähr 10 Kohlenstoffatomen aufweist, wurde entdeckt, daß Oligonukleotide, die eine durch Benzoyl ('bz') oder Isobutyryl ('ibu') geschützte Cytidinbase enthalten und die derartigen Reagenzien unterworfen wurden, eine Cytidin-Nebenproduktbildung aufwiesen, insbesondere in der Form von N-Methylcytidin. Obwohl derartige Reagenzien die Fähigkeit zur schnellen Abspaltung und Schutzaufhebung von Oligonukleotiden ergeben, verglichen mit, u.a. Ammoniak, führte die sich ergebende Nebenproduktbildung demgemäß zum Bedarf für eine andere Schutzgruppe für Cytidinbasen, die nicht zu einer derartigen Nebenproduktbildung führen würde. Derartige Schutzgruppen erfordern mindestens die folgenden Kriterien: vergleichbare Empfindlichkeit für Schutzaufhebung wie bz und ibu und nicht zur Bildung einer statistisch signifikanten Nebenproduktbildung (d.h., durchschnittlich weniger als ungefähr 0,01 %) führend. Zusätzlich muß das sich ergebende Oligonukleotid seine

biologische Aktivität zurückerhalten. D.h., das Oligonukleotid muß bezüglich komplementärer Basenpaarung zwischen z.B. den Basen C und G, verwendbar sein.

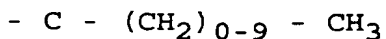
5 Die vorliegende Erfindung verwendet eine Schutzgruppe, die eine Carbonylgruppe umfaßt, die eine hieran angebundene geradkettige Alkylgruppe aufweist, wobei die Alkylgruppe von 1 bis ungefähr 10 Kohlenstoffatome, bevorzugt von 1 bis ungefähr 6 Kohlenstoffatome, bevorzugter von 1 bis ungefähr 3 Kohlenstoffatome, am meisten bevorzugt 1 Kohlenstoffatom, aufweist. Wenn die vorliegende Erfindung in Verbindung mit einem Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz verwendet wird, das mindestens ein geradkettiges Alkylamin umfaßt, das von zwischen 1 bis ungefähr 10 Kohlenstoffatomen aufweist, führt sie zu einer signifikant verminderten Cytidin-Nebenproduktsbildung. Wie hier verwendet, bedeutet der Begriff 'instabil' die Fähigkeit, eine chemische Umwandlung vollziehen. Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Schutzgruppen können wie folgt dargestellt werden:

20

O

||

25



Wie hier verwendet, umfaßt der Begriff 'Oligonukleotide' synthetische Oligonukleotide sowie modifizierte Oligonukleotide, d.h., bei denen das 3'-Ende, das 5'-Ende, der Zucker oder die heterozyklische Base modifiziert sind, sowie Modifizierung des Phosphatrückgrats (z.B. Methylphosphonate, Phosphorothioate und Phosphoramidate). Zusätzlich können Oligonukleotide auch Oligonukleotide einschließen, die eine angebundene Reportergruppe, z.B. Biotin, Avidin, Haptene, Farbstoffe, fluoreszente, chemilumineszente, enzymatische oder radioaktive Markierungen, und andere feste Träger als der feste

Träger, von dem aus das Oligonukleotid synthetisiert wurde, aufweisen.

Eine gemäß der Beschreibung besonders bevorzugte Schutzgruppe 5 ist Acetyl, wie folgt dargestellt:



15 und wird hier als 'Ac' bezeichnet. Folglich wird mit Acetyl geschütztes Desoxycytidin hierin als 'dC<sup>Ac</sup>' bezeichnet.

Ohne sich auf irgendeine bestimmte Theorie festlegen zu wollen, wird angenommen, daß die relative Instabilität 20 von bz gegenüber ibu für eine Zunahme an Cytidin-Nebenproduktbildung in der Anwesenheit eines Alkylamin-Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz verantwortlich ist. Ibu ist (relativ) instabiler als bz; In der Anwesenheit eines Alkylamins führen Oligonukleotide, die eine mit ibu geschützte 25 Cytidinbase enthalten, zu einem geringeren Prozentsatz von N-Methylcytidin-Nebenproduktbildung, als vergleichbare Oligonukleotide, die mit bz geschütztes Cytidin enthalten. Demgemäß wurde davon ausgegangen, daß chemische Anteile, die als Schutzgruppen funktionieren könnten, und die instabiler als bz 30 waren, statistisch weniger Cytidin-Nebenproduktbildung zeigen könnten. Es wurde ferner davon ausgegangen, daß die Instabilität durch die Elektronenabgabe der zur der Carbonylgruppe benachbarten Gruppen beeinflusst wird. D.h., wenn die Elektronenabgabe zunimmt, wird der Carbonylkohlenstoff weniger 35 elektropositiv und deshalb weniger empfänglich für einen nukleophilen Angriff durch das Schutzaufhebungsreagenz. Z.B. ist die Elektronenabgabe von den sekundären (d.h. verzweigten) Kohlenstoffatomen an den Carbonylkohlenstoff von ibu größer

als die Abgabe von dem primären Kohlenstoffatom an den Carbonylkohlenstoff von Ac .

Acetyl ist signifikant instabiler als ibu und ist zusätzlich  
5 das am wenigsten 'sperrige' der beschriebenen definierten  
Schutzgruppen. Acetyl kann einfach an die exozyklische Amino-  
gruppe der Cytidinbase gebunden werden, und, wie experimentell  
festgestellt, kann es effizient und wirksam in Verbindung mit  
u.a. Alkylamin-Abspaltungs-/Aufhebungsreagenzien ohne stati-  
10 stisch signifikante Nebenproduktproduktion verwendet werden.

### Beispiele

15 Die folgenden Beispiele, die sich auf bevorzugte Ausführungs-  
formen der Erfindung beziehen, sind weder dazu vorgesehen,  
eine Einschränkung der Offenbarung oder der folgenden An-  
sprüche zu ergeben, noch sollten sie so aufgefaßt werden:

#### 20 I. Material und Methoden

##### A. Reagenzien

##### 1. Abspaltungs-/Schutzaufhebungsreagenz

25

Alle Chemikalien waren mindestens von ACS-Güteklasse.  
Ammoniumhydroxid wurde von Aldrich (Milwaukee, WI.; Cat. Nr.  
22, 122-8) erhalten. Methylamine, 40 Gewichts-% Lösung in  
Wasser, wurde von Aldrich (Cat. Nr. M2, 775-1) erhalten, genau  
30 wie T-Butylamin (Cat. Nr. B8, 920-5).

Methylamin-/T-Butylamin-Reagenz wurde durch Mischen eines 1:1-  
Volumen-zu-Volumen-Verhältnisses, gefolgt von Schütteln für 5  
Minuten bei Raumtemperatur und Lagerung bei 4°C hergestellt.  
35 Ammoniumhydroxid wurde nach den Anweisungen des Lieferanten  
gelagert.

## 2. Geschützte Desoxynukleoside

Die folgenden geschützten Desoxynukleoside wurden von der Sigma Chemical Corp. (St. Louis, Mo.) erhalten:

5

- a) dA<sup>bz</sup> (Cat. Nr. B 6130);
- b) dC<sup>bz</sup> (Cat. Nr. B 5882);
- c) dC<sup>ibu</sup> (Cat. Nr. I 6261); und
- d) dG<sup>ibu</sup> (Cat. Nr. I 6007).

10

Thymidin wurde von der Sigma (Cat. Nr. T 5018) erhalten.

### B. Im Handel erhältliche Vorschriften

15

1. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = 'PCR')

Eine PCR-Analyse von Oligonukleotid-Primern bzw. Startern, die dem beschriebenen Abspaltungs-/Schutzaufhebungs-Reagenz ausgesetzt wurden, wurde unter Verwendung eines Perkin Elmer Cetus GeneAmp<sup>TM</sup> DNA Amplifikations-Reagenz-Materialsatz mit AmpliTag<sup>TM</sup> (Part Nr. N801-0055) durchgeführt. Die Herstelleranweisungen wurden befolgt.

25

### 2. DNA-Sequenzierung

Eine Sequenzierungsreaktion wurde unter Verwendung einer M13mp18 einsträngigen DNA-Matrize (New England Biolabs, Cat. Nr. 30404-C) gemäß der Vorschrift der United States Biochemical Sequenase Version 1.0 unter Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dATP durchgeführt.

35

### C. Instrumente

#### 1. Automatisierter DNA-Synthetisierer

5 Die Synthese von Oligonukleotiden wurde unter Verwendung eines Biosearch 8750<sup>TM</sup> DNA-Synthetisierers durchgeführt; kontrolliertes Porenglas (CPG), Porengröße 500Å-1000Å wurde für das feste Trägermaterial verwendet. Homo- und Hetero-oligonukleotide verschiedener Längen wurden nach den Anweisungen des  
10 Herstellers synthetisiert.

#### 2. Kapillar-Elektrophorese

Die Kapillar-Elektrophorese von Oligonukleotiden wurde  
15 auf einem Beckman Instruments, Inc. P/ACE<sup>TM</sup> 2000 High Performance Capillary Electrophoresis System durchgeführt. Eine 37 cm U100P Urea Gel-Säule (Beckman, Cat. Nr. 338480) wurde verwendet. Proben wurden über das elektrokinetische Injektionsverfahren (10 kV, 3 Sekunden) auf die Säulen aufgebracht; eine  
20 Trennung wurde bei 11 kV/cm für 30-90 Minuten, abhängig von der Oligonukleotidlänge, durchgeführt. Tris-Hydroxymethylaminomethan ('TRIS') - Borat 7M Urea Lauf-Puffer (Beckman, Gel Buffer Kit, Cat. Nr. 338481) wurde verwendet. Die Absorptionserfassung lag im Bereich von 0,05 - 2,0 OD<sub>260nm</sub>/ml,  
25 die hauptsächlich von der Länge des Oligonukleotids abhängt.

#### 3. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie ('High Pressure Liquid Chromatography' = 'HPLC')

30 Eine HPLC-Analyse wurde auf einem Beckman Instruments System Gold<sup>TM</sup> HPLC Programmable Solvent Module 126, ausgestattet mit einem Dioden-Feld-Detektor Module 168 und Autosampler 507 durchgeführt. Eine C<sub>18</sub> Ultrasphere<sup>TM</sup> HPLC Säule (Beckman, Cat. Nr. 235329; 5µ Partikel, 4,6 mm x 25 cm) wurde verwendet.  
35 Flasche A enthielt 0,1M Ammoniumacetat, pH 6,9; Flasche B enthielt HPLC-Güteklasse-Azetonnitril. Das System wurde in einer Gradient-Betriebsweise wie folgt betrieben (1 ml/min Durchflußrate): 0-10 Minuten; 85% Flasche A, 15% Flasche B; 20-25 Minu-



ten: 75% Flasche A, 25% Flasche B; 25-27 Minuten: 50% Flasche A, 50% Flasche B; 27-30 Minuten: 50% Flasche A, 50% Flasche B; 30-35 Minuten: 100% Flasche A, 0% Flasche B.

5

## II. Beispiel I. Herstellung von 2'-Desoxycytidin

Einer Suspension aus 71 g (269,3 mmol) von 2'-Desoxycytidin-Hydrochlorid (Penninsula, Belmont, CA.; Cat. Nr. N1012) und 10 1600 ml Methylenchlorid wurden 42 ml (301 mmol) Triethylamin (Aldrich; Cat. Nr. 206-3) beigemischt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden energisch gerührt. Ein farbloser, kristalliner Feststoff wurde gesammelt, mit Methylenchlorid gewaschen (3x 80 ml) und luftgetrocknet. 61 g 15 (99% Ausbeute) eines Materials, das einen Schmelzpunkt innerhalb des Bereichs von 185° bis 195°C aufwies, wurde erhalten; der veröffentlichte Schmelzpunkt der freien Base 2'-Desoxycytidin ist 185° bis 195°C.

20

## Beispiel II. Herstellung von N<sup>4</sup>-Acetyl-2'-Desoxycytidin

61,29 g (270 mmol) des Materials von Beispiel 1, das in 1300 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid ('DMF') gelöst 25 wurde (Aldrich; Cat. Nr. 22, 70506), wurden 28 ml (296 mmol) Acetanhydrid (Aldrich; Cat. Nr. 11, 004-3), hinzugefügt, und die sich ergebende Mischung wurde bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Das DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der sich ergebende Rückstand wurde mit dem 30 Überschuß von 100 ml Dimethyläther behandelt; 71,4 g (98% Ausbeute) eines kristallinen Produkts wurde erhalten und durch Filtration gesammelt, gründlich mit Dimethyläther gewaschen, und über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> für 3 Stunden getrocknet. Dieses Produkt hatte einen Schmelzpunkt von 150° bis 170°C; der veröffentlichte 35 lichte Schmelzpunkt für dieses Produkt ist 154° bis 176°C.

Das errechnete zusammengesetzte Molekulargewicht für N<sup>4</sup>-Acetyl-2'-Desoxycytidin-H<sub>2</sub>O (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O) ist: C-

45,99; H-5,97; und N-14,63. Das kristalline Produkt hatte die folgende, wie durch Elementaranalyse festgestellte, zusammengesetzte Molekularformel : C-45,71; H-6,10; und N-14,38. Es wurde durch Infrarot-Spektren weiterhin festgestellt, daß das kristalline Produkt einen einzigen Carbonylamid-Anteil und ein einziges Carbonylringamid enthielt. Die Struktur wurde weiterhin durch magnetische Kernresonanz ('Nuclear Magnetic Resonance' = 'NMR') bestätigt. Das vorstehende ist mit der Struktur von N<sup>4</sup>-Acetyl-2'-Desoxycytidin vereinbar.

10

Beispiel III. Herstellung von N<sup>4</sup>-Acetyl-5'-O- (4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-Desoxycytidin

15 70 g (260,2 mmol) des Produkts von Beispiel 2 wurden durch Co-Evaporation mit 2x50 ml trockenem Pyridin (Aldrich; Cat. Nr. 27,097-0) getrocknet, dann in 1300 ml trockenem Pyridin aufgenommen, eisgekühlt; danach wurden 105 g (314 mmol) von 4,4-Dimethoxy-Tritylchlorid ('DMTr-Cl') (Peninsula; Cat. Nr. 20 N4011) zu der Lösung hinzugefügt. Die Mischung wurde bei 5°C für 20 Stunden gerührt. Pyridin wurde unter vermindertem Druck entfernt, und der sich ergebende Rückstand wurde in 3,0 l Methylenchlorid aufgenommen, mit 2x2 l 5%igem Natriumhydrogencarbonat (Aldrich; Cat. Nr. 23.931-3) und 1x2 l entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Schicht wurde über Natriumsulfat getrocknet und fast zur Trockene konzentriert.

30

Das Produkt wurde auf einer 6x80 cm Silica-Gel-Säule (Aldrich; 70-230 Maschen; Cat. Nr. 28.864-4) durch Gradient-Elution mit 5 20 l 0-6% Methylen-chlorid-methanol gereinigt. Gewünschte Fraktionen wurden gesammelt, zu ungefähr 300 ml konzentriert und tropfenweise zu 3,0 l gekühltem (0°C) Hexan (Baxter, McGaw Port, IL., Cat. Nr. 216-4 DK) hinzugefügt, um das Produkt auszufällen. Das ausgefällte Produkt wurde gefiltert, mit 10 Hexan gewaschen und luftgetrocknet, um 117 g (79% Ausbeute) eines Produktes zu erhalten.

Das errechnete zusammengesetzte Molekulargewicht für N<sup>4</sup>-Acetyl-5'-O- (4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-Desoxycytidin 15 (C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) ist: C-67,24; H-5,82; und N-7,35. Das Produkt hatte die folgende, wie durch Elementaranalyse festgestellte, zusammengesetzte Molekularformel: C-66,02, H-6,05; und N-6,91. Es wurde weiterhin durch Infrarotspektren festgestellt, daß das kristalline Produkt einen einzigen Carbonylamid-Anteil 20 und ein einziges Carbonylringamid enthielt. Die Struktur wurde weiterhin durch NMR bestätigt. Das vorstehende ist mit der Struktur von N<sup>4</sup>-Acetyl-5'-O (4,4-Dimethoxytrityl)-2'-Desoxycytidin vereinbar.

25

Beispiel IV.

Herstellung von N<sup>4</sup>-Acetyl-5'-O (4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-Desoxycytidin-3'-O (N,N-Diisopropyl)-β-Cyanoäthyl-Phosphoramidit.

30

11,44 g (20 mmol) des Produkts von Beispiel III wurden durch aufeinanderfolgende Co-Evaporation mit Pyridin, Toluol und Tetrahydrofuran ('THF') (Aldrich; Cat. Nr. 18.656-2) getrocknet, unter Rückflußkühlung erhitzt bzw. refluxiert und über 35 CaH<sub>2</sub> destilliert. Der getrocknete Rückstand wurde in 100 ml trockenem THF gelöst und 14 ml (80 mmol) von N,N,N-Diisopropyl-äthylamin wurden dazu hinzugefügt. Dem folgte eine 5 minütige tropfenweise Zugabe (über eine Spritze) von 8,92 ml (40 mmol)

$\beta$ -Cyanoäthyl-monochloro-N,N-Diisopropyl-Phosphoramidit  
 mit konstantem Rühren unter Argon bei Raumtemperatur. Nach 60  
 Minuten Rühren wurde 1,2 ml Methanol (40 mmol) der Mischung  
 hinzugefügt, und das Schütteln weitere 60 Minuten fortgesetzt,  
 5 und bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 600 ml  
 Äthylacetat (Baxter; Cat. Nr. CP80132-4DK) gelöst, mit 10%  
 Natriumhydrogencarbonat  $\text{Na}_4\text{CO}_3$  (2x500 ml) gewaschen und über  
 Natriumsulfat  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die organische Schicht wur-  
 de eingedampft und der Rückstand wurde in 50 ml Äther gelöst;  
 10 dieses wurde anschließend durch tropfenweise Zugabe zu 700 ml  
 Hexan bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Mischung wurde dekan-  
 tiert und das ausgefällte Produkt in 100 ml Äther aufgelöst, ge-  
 folgt von der Zugabe von 700 ml Hexan und Rühren bei Raumtempe-  
 ratur. Diese Mischung wurde dekantiert und das Produkt in 500 ml  
 15  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, gefolgt von der Zugabe von 30 g basischem  
 Aluminiumoxid (Aldrich; Cat. Nr. 19.944-3) und Rühren für eine  
 Stunde bei Raumtemperatur. Diese Mischung wurde in einem  
 Sinterglastrichter gefiltert, eingedampft und in einem  
 Exsikkator über  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  unter vermindertem Druck  
 20 getrocknet. 11 g (76% Ausbeute) eines Produkts wurden  
 erhalten; wie durch Umkehrphasen-HPLC festgestellt, betrug die  
 Reinheit 98,4%.

Das errechnete zusammengesetzte Molekulargewicht für  $\text{N}^2$ -Ace-  
 25 tyl-5'-O- (4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-Desoxycytidin-3'-O (N,N-  
 diisopropyl)- $\beta$ -cyanoäthyl-Phosphoramidit ( $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ )  
 ist: C-63,80; H-6,53; N-9,07; und P-4,01. Die zusammengesetzte,  
 wie durch Elementaranalyse festgestellte Molekularformel des  
 Produkts, war: C-62,51; H-6,84; N-8,68, und P-3,61. Es wurde  
 30 weiterhin durch Infrarot-Spektren festgestellt, daß dieses Pro-  
 dukt einen einzigen Carbonylamid-Anteil, ein einziges Carbo-  
 nylringamid und eine einzige C=N-Gruppe enthielt. Die Struktur  
 wurde weiterhin durch NMR bestätigt. Das vorstehende ist  
 mit der Struktur von  $\text{N}^4$ -Acetyl-5'-O- (4,4'-Dimethoxytrityl)  
 35 -2'- Desoxycytidin-3'-O-(N,N-Diisopropyl)- $\beta$ -cyanoäthyl-  
 Phosphoramidit vereinbar.

Das Produkt in Beispiel IV wurde als ' $\text{dC}^{\text{Ac}}$ ' bezeichnet, um

anzugeben, daß es sich um ein Desoxycytidin handelt, das eine Acetyl-Schutzgruppe aufweist. Ein schematisches Diagramm, das die Herstellungsschritte der Beispiele I - IV angibt, ist in Fig. 1 dargestellt.

5

#### Beispiel V: Cytidin-Nebenproduktbildung

Wie erwähnt, ist Desoxycytidin üblicherweise am meisten für die Nebenproduktbildung während der Schutzaufhebung von Oligonukleotiden, die Desoxycytidin enthalten, empfänglich. Typischerweise verläuft eine derartige Nebenproduktbildung über Transamination.

Wie dem Fachmann bekannt ist, wird die Synthese von Oligonukleotiden typischerweise mit der Absicht durchgeführt, das Endprodukt so schnell wie möglich zu erhalten. Es ist jedoch gelegentlich möglich, daß das solubilisierete bzw. löslich gemachte Oligonukleotid, bei dem der Schutz aufgehoben wurde, für längere Zeitabschnitte in einem Schutzaufhebungs-Reagenz verbleiben kann. Wie dem Fachmann weiterhin bekannt ist, kann eine derartige Zunahme an Zeit, wenn das Oligonukleotid sich im Reagenz befindet, die Wahrscheinlichkeit eines Transaminationsereignisses erhöhen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Nebenproduktbildung erhöht wird.

25

Die Cytidin-Nebenproduktbildung wurde durch Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung von sowohl Methylamin als auch Methylamin/T-Butylamin als das Reagenz über mehrere Zeiträume und Temperaturen hinweg untersucht. Die 'traditionellen' Cytidinschutzgruppen, 'bz' und 'ibu' wurden ebenso wie eine Acetylschutzgruppe studiert. Das beobachtete Nebenprodukt war, wenn ein derartiges Reagenz (wie durch Kernmagnetresonanz bestätigt) verwendet wurde, N-Methylcytidin. Die Prozentsätze der N-Methyldesoxycytidin-Bildung, bezogen auf Desoxycytidin, sind unten dargestellt, auf der Grundlage einer lösungsgestützten Schutzaufhebung von Desoxycytidin, das mit einer Acetylschutzgruppe geschützt ist:

35

Tabelle I

5

## Prozentsätze der N-Methylcytidin-Bildung\*

Temperatur

<u>10 Reagenz</u>	<u>25°C</u>	<u>37°C</u>	<u>65°C</u>
Methylamin	<0,01** (60 Min.)	<0,01 (20 Min.)	<0,01 (5 Min.)
15 Methylamin (16 Stunden)	0,05	0,25	2,5
Methylamin/ T-Butylamin 20 (16 Stunden)	<0,01	<0,01	0,6%

\* - durchschnittliche Prozentsätze

\*\* - 0,01% ist die niedrigste Nachweisungs-Grenze des Instruments.

25

30 Diese Ergebnisse zeigen an, daß für eine typische Oligonukleotid-Synthese (d.h. eine, bei der der Forscher wünscht, das fertiggestellte Endprodukt sobald wie möglich zu erhalten), das Methylamin nicht zu einer statistisch signifikanten Cytidin-Nebenproduktbildung führt. Jedoch mit einer Zunahme an

35 Zeit, die das Oligonukleotid in dem Reagenz verbleibt, so nimmt ebenfalls die Cytidin-Nebenproduktbildung zu. Folglich ist die Verwendung eines Transamination-Unterdrückungsreagenz ('Transamination Suppression Reagent' = 'TSA') nützlich. Ein

'TSA' wird hier definiert als ein nützliches Mittel bei der Unterdrückung von Transamination, d.h. dem Austausch von Aminen auf einem Nukleotid, der sich typischerweise als Nebenproduktbildung zeigt. Vorzugsweise ist TSA ein Mittel (oder mehrere Mittel), das einen Polaritätsindexwert aufweist, der mindestens 1,5 mal kleiner als der von Wasser ist, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, die aus geradkettigen, verzweigten, zyklischen, gesättigten und ungesättigten Alkylaminen besteht, die von zwischen 1 und ungefähr 10 Kohlenstoffatomen aufweisen, und die weiterhin funktionelle Gruppen umfassen können; Ethanol; Methanol; Isopropylamin; Azetylnitril; Dimethylformamid; Tetrahydrofuran; und Kombinationen davon. Beispiele für Alkylamine, wie definiert, schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, T-Butylamin, Ethylamin, Propylamin, Isopropylamin, Dimethylamin, Diethylamin, Trimethylamin und sekundäres Butylamin ein. Die Daten zeigen, daß bezogen auf Methylamin, ein Reagenz, das Methylamin und Butylamin als ein TSA umfaßt, die Cytidin-Nebenproduktbildung signifikant reduziert.

20

Eine sekundäre Studienreihe wurde entlang dieser Linien durchgeführt. Für diese Studien wurde die Nebenproduktbildung für  $dC^{Ac}$ ,  $dC^{ibu}$ ,  $dC^{bz}$ ,  $dG^{ibu}$ ,  $dA^{bz}$  und  $dT$  (als ein relativer Prozentsatz der Nicht-Nebenproduktbildung für die Nukleoside) bei verschiedenen Zeitpunkten und Temperaturen unter Verwendung von Methylamin/T-Butylamin als das Reagenz untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle II dargestellt:

30

35

Tabelle II

## 5 Prozentsätze der Nebenproduktbildung\*

Temp. (°C)	Reaktions- zeit	c <sup>Ac</sup>	c <sup>ibu</sup>	c <sup>bz</sup>	G <sup>ibu</sup>	A <sup>bz</sup>	T
10 25	90 Min.	**	0,15	10,0	**	**	**
25	16 Std.	**	***	***	**	**	**
37	30 Min.	**	0,15	10,0	**	**	**
37	5 Std.	**	***	***	**	**	**
37	16 Std.	**	***	***	**	**	**
15 65	5 Min.	**	0,15	10,0	**	**	**
65	1 Std.	**	***	***	**	**	**
65	16 Std.	0,6	***	***	**	**	**
80	3 Min.	**	0,15	10,0	**	**	**
80	1 Std.	***	***	***	**	**	**

20

\* Mittelwerte

\*\* &lt; 0,01

\*\*\* wegen der hohen Prozentsätze bei optimaler

25 Temperatur/Reaktionszeit nicht untersucht

- 30 Diese Ergebnisse zeigen zumindest mehrere Dinge. Erstens zeigen die Daten hinsichtlich der dC-Schutzgruppen, daß Acetyl-Schutzgruppen bessere Ergebnisse ergeben, wenn sie in Verbindung mit dem geradkettigen Alkylamin-Abspaltungs- und Schutzauhebungs-Reagenz verwendet werden; die 'traditionellen'
- 35 Cytidin-Schutzgruppen ergaben eine signifikant höhere Nebenproduktbildung. Zweitens führt dieses Schutzauhebungs- und Abspaltungs-Reagenz nicht zu einer statistisch signifikanten Nebenproduktbildung für irgendeines der geschützten



Desoxynukleoside bei jeder der untersuchten Temperaturen oder Reaktionszeiten, mit der Ausnahme der Schutzaufhebung von dC<sup>Ac</sup> bei den erhöhten Temperaturen und bei längeren als den erwünschten Reaktionszeiten. Folglich wird für Oligonukleotide, die Desoxycytidin umfassen, das mit einer Acetyl-Schutzgruppe geschützt ist, bevorzugt, daß bei derartigen erhöhten Temperaturen verlängerte Reaktionszeiten nicht verwendet werden.

10      Beispiel VI:      Enzymatische Digestionsanalyse von nicht-gereinigten Oligonukleotiden

Eine Analyse der Zusammensetzung von mehreren Oligonukleotiden wurde unter Verwendung enzymatischer Digestion und Umkehrphasen-HPLC-Verfahren durchgeführt. Diese Studien wurden unter Verwendung von Desoxycytidinen durchgeführt, die mit einer Acetyl-Schutzgruppe und einer traditionellen Schutzgruppe, bz geschützt waren; alle anderen Schutzgruppen waren zwischen den Oligonukleotiden konsistent. 35-mers, 51-mers und 101-mers, die die folgenden Sequenzen aufwiesen, wurden analysiert:

35-mer

5' -CAG-TGC-AGC-TCC-TAG-CAG-CCT-AGC-GTA-CTA-GTC-TT-3'

25

51-mer

5' -CAG-TCC-TAG-TCA-CAG-TCC-AGT-CGC-TCA-AGC-GTC-CAG-TTG  
CAC-AGG-TCA-CCT-3'

30

101-mer

5' -GCT-GCC-AGT-TCG-GTC-ATC-CGA-TCC-TCG-GTC-ACG-CAA-  
CTG-TCA-ACG-GCA-CCT-ACT-CCT-CGT-AAC-GTA-GGA-CAG-TCC-  
GAT-TCG-C4C-GTG-CAA-AGC-CCA-TTC-AT-3'

35

Die Oligonukleotide wurden unter Verwendung eines Reagenz abgespalten und der Schutz aufgehoben, wobei das Reagenz Methylamin/T-Butylamin umfaßte, bei 25°C für 90 Minuten, oder Ammoniak für 3 Stunden bei 65°C; löslich gemachte Oligonukleotide, bei denen der Schutz aufgehoben wurde, wurden vor der Analyse nicht gereinigt. Die Ergebnisse sind wie folgt in Tabelle III:

Tabelle III

15

## Zusammensetzungsanalyse

			Festgestellt	
Theoretisch			Oligonukleotide	Oligonukleotide
			die dC <sup>Ac</sup> um-	die dC <sup>bz</sup> um-
			fassen	fassen
20				
	C	11	10,67	10,62
35-mer	G	8	7,88	7,84
	T	9	9,65	9,41
25	A	7	6,80	7,13
-----				
	C	18	17,04	17,36
	G	11	11,71	11,72
51-mer	T	11	11,61	11,07
30	A	11	10,65	10,85
-----				
	C	35	33,80	33,53
	G	22	20,74	20,70
101-mer	T	22	21,78	21,73
35	A	22	25,09	25,04

Die theoretische Zusammensetzung der verschiedenen nicht-gereinigten Oligonukleotide und die festgestellte Zusammensetzung korrelieren gut. Zusätzlich zeigt der Unterschied bei den 5 Desoxycytidin-Schutzgruppen, gestützt auf die obigen Daten, einen statistisch signifikanten Unterschied in den Ergebnissen nicht an.

10      Beispiel VII:      Polyacrylamidgel-Elektrophorese  
(Polyacrylamid Gel Electrophoresis = 'PAGE')

Analysen von 35-mers (35% dC<sup>bz</sup>; 35% dC<sup>Ac</sup>; 100% dC<sup>bz</sup>; und 100% dC<sup>Ac</sup>), 51-mers (35% dC<sup>bz</sup>; 35% dC<sup>Ac</sup>; 100% dC<sup>bz</sup>; und 100% dC<sup>Ac</sup>) und 101-mers (35% dC<sup>bz</sup>; 35% dC<sup>Ac</sup>; 100% dC<sup>bz</sup>; und 100% dC<sup>Ac</sup>) wurden durch PAGE untersucht. Die Hetero-35-, 51- und 101-mers waren wie in Beispiel IV beschrieben und für die Homo-35-, 51- und 101-mers wurde das Oligomer von einem nicht löslich gemachten Thymidin synthetisiert. Oligonukleotide, die dC<sup>Ac</sup> umfaßten, wurden unter Verwendung eines Reagenz abgespalten und der Schutz aufgehoben, wobei das Reagenz Methylamin/T-Butylamin umfaßte, für 90 Minuten bei 65° C. Oligonukleotide, die dC<sup>bz</sup> umfaßten, wurden unter Verwendung von Ammoniak abgespalten und der Schutz aufgehoben, für 3 Stunden bei 65°C.

Ein 22 cm x 16,5 cm denaturierendes Gel wurde durch Zusatz von 107,3 ml entionisiertem Wasser zu 100 gm eines vorgemischten Acrylamid/Methylenbisacrylamid (29:1) (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Cat. Nr. 100-151) hergestellt, um eine 50%ige Stammlösung zu erhalten. Zu 20 ml der 50%igen Stammlösung wurde 22,5 g Urea, 5 ml 10 x Trisborat/EDTA ('TBE') und genügend entionisiertes Wasser hinzugefügt, um 50 ml zu erhalten. Die Lösung wurde gerührt und derart erhitzt, daß die festen Bestandteile gelöst wurden. Danach wurden 20 mg Ammoniumpersulfat und 20 µl N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin ('TEMED') hinzugefügt; diese Lösung wurde in saubere Platten gegossen und die Polymerisation von Gelen wurde für eine Stunde

ermöglicht, wobei nach einem Vorlauf mit 1 x TBE bei 20 mA für eine Stunde 0,2 bis 1,0 OD<sub>260nm</sub> von jedem Oligonukleotid zu 10 µl von 10 m Urea hinzugefügt wurden. Die 20 µl Mischungen wurden auf das Gel aufgegeben und die 5 Elektrophorese bei 28 mA für 2 bis 4 Stunden, abhängig von der Länge der Oligonukleotide, durchgeführt. Banden wurden durch UV-Abschattung auf einer TLC-Fluoreszenzplatte oder durch Ethidiumbromid-Anfärbung sichtbar gemacht.

10 Photographische Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt, bei denen die Bahnen wie folgt definiert sind:

15

	<u>Bahn</u>	<u>Oligonukleotid</u>
	1	35-mer (35% dC <sup>Ac</sup> )
	2	35-mer (35% dC <sup>bz</sup> )
20	3	35-mer (100% dC <sup>Ac</sup> )
	4	35-mer (100% dC <sup>bz</sup> )
	5	51-mer (35% dC <sup>Ac</sup> )
	6	51-mer (35% dC <sup>bz</sup> )
	7	51-mer (100% dC <sup>Ac</sup> )
25	8	51-mer (100% dC <sup>bz</sup> )
	9	101-mer (35% dC <sup>Ac</sup> )
	10	101-mer (35% dC <sup>bz</sup> )
	11	101-mer (100% dC <sup>Ac</sup> )
30	12	101-mer (100% dC <sup>bz</sup> )

Die Ergebnisse aus Fig. 2 zeigen, daß die Oligonukleotide, die Methylamin/T-Butylamin-Reagenz und der Ac-Schutzgruppe ausgesetzt waren, beinahe identische PAGE-Muster ergaben, 35 verglichen mit den Oligonukleotiden, die Ammoniak und der traditionellen Desoxycytidin-Schutzgruppe bz, ausgesetzt waren.

## Beispiel VIII: Kapillar-Elektrophorese

Heterogene 51-mer-Oligonukleotide, die entweder 35% dC<sup>bz</sup> oder 35% dC<sup>Ac</sup> umfaßten, wurden entweder Ammoniak für 5 3 Stunden bei 65°C oder Methylamin/T-Butylamin für 90 Minuten bei 25°C ausgesetzt und durch Kapillar-Elektrophorese-verfahren analysiert. Elektropherogramme für die Oligonukleotide, die Ammoniak und einem Reagenz ausgesetzt waren, das Methylamin/T-Butylamin umfaßte, sind in den Fig. 3 bzw. 4 10 dargestellt.

Die Ergebnisse aus den Figuren 3 und 4 sind bezüglich der Zeit von der Probeführung bis zur Erfassung des 51-mer nahezu identisch. Der Gesamtprozentsatz der integrierten Flächen 15 unterhalb der Hauptpeaks, 66,902 für Fig. 3 und 66,575 für Fig. 4, ist auch nahezu identisch. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, daß das Methylamin/T-Butylamin-Reagenz und die Desoxycytidin-Schutzgruppe Ac verhältnismäßig identische lösliche Oligonukleotide mit aufgehobenem Schutz gegenüber 20 Ammoniak und der traditionellen Desoxycytidin-Schutzgruppe bz ergeben.

## Beispiel X: Polymerase-Kettenreaktion

25

Die Beispiele sagen aus, daß ein Schutzaufhebungs-/Ab-spaltungs-Reagenz, das ein geradkettiges Alkylamin umfaßt, das zwischen 1 und ungefähr 10 Kohlenstoffatome und eine Acetyl-Schutzgruppe umfaßt, dazu verwendet werden kann, Oligonukleo- 30 tide schnell und wirksam abzuspalten und den Schutz aufzuheben, die, u.a. Desoxycytidin mit statistisch nicht signifikanter Nebenproduktbildung umfassen. Wie dem Fachmann bekannt ist, ist es jedoch notwendig, derartige Oligonukleotide für eine Vielzahl von Verfahren verwenden zu können.

35

Oligonukleotide, die als Starter in einer Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden, wurden erzeugt und einem Methylamin/T-Butylamin-Reagenz (bei dem die Desoxycytidine mit Ac ge-

schützt waren) für 90 Minuten bei 25°C ausgesetzt. Die Starter waren wie folgt:

18-mer

5

5'-CGC-CAG-GGT-TTT-CCC-AGT-3'

22-mer

10

5'-TTC-TGG-CGT-ACC-GTT-CCT-GTC-T-3'

Die Matrize war M13mp18 RFI DNA (New England Biolabs, Cat. Nr. 400-18). Die Herstelleranweisungen wurden bei der Verwendung 15 des GeneAmp Reagent-Materialsatzes befolgt.

Die Anfangsschmelztemperatur betrug 95°C für 7 Minuten; 25 Zyklen wurden auf einem Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler mit dem folgenden Zyklusprofil laufen gelassen:

20

	Temp. (°C)	Zeit (sek)
Seq. #1	94	1
Seq. #2	94	60
25 Seq. #3	37	1
Seq. #4	37	120
Seq. #5	72	1
Seq. #6	72	180

30 Das sich ergebende 957 Basenpaar PCR-Produkt wurde auf einem 1% Agarosegel in TRIS-Azetat/EDTA ('TAE') der Elektrophorese unterworfen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Photographische Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt, wobei die Bahnen wie folgt bezeichnet werden:

35

5	Bahn 1	957 bp Produkt	(unter Verwendung von Methylamin/T-Butylamin-Reagenz und abgeleitete Starter und Acetyl-Schutzgruppe für Desoxycytidin);
10	Bahn 2	957 bp Produkt	(unter Verwendung von Ammoniak abgeleitete Starter und bz-Schutzgruppe für Desoxycytidin);
15	Bahn 3	Gel Markierer	(Lambda-DNA, digeriert mit Hind III, 2322 und 2027 bp Markierer); und
20	Bahn 4	Gel Markierer	(PBR322 DNA digeriert mit Hinf I, 1632 und 506 bp Markierer)

Die in Fig. 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß unter Verwendung des Methylamin/T-Butylamin-Reagenz abgeleitete Starter und die Acetyl-Schutzgruppe zur Herstellung eines amplifizierten Produkts führten, das im wesentlichen zu dem identisch war, das von Startern gewonnen wurde, die durch Ammoniak-Abspaltung und Schutzaufhebung und unter Verwendung einer bz-Schutzgruppe für Desoxycytidin erzeugt wurden.

30

#### Beispiel XI: DNA-Sequenzierung

Zwei Sätze von 18-mers wurden unter Verwendung einer Acetyl-Schutzgruppe für Desoxycytidin synthetisiert, und für vergleichende Zwecke bz, und wurden einem Reagenz, das Methylamin/T-Butylamin umfaßte, für 90 Minuten bei 25°C, bzw. Ammoniak für 3 Stunden bei 65°C, ausgesetzt. Die 18-mers hatten die folgende Sequenz:

18-mer

5'-CGC-CAG-GGT-TTT-CCC-AGT-3'

5

Die löslich gemachten Oligomere, bei denen der Schutz aufgehoben war, wurden unter Verwendung eines Sep Pak (Waters, Part Nr. 5190) DNA Reinigungsmaterialsatzes gereinigt. Diese gereinigten Oligomere wurden als Starter für Sequenzierungszwecke verwendet. Die Matrize war M13mp18-einsträngige DNA (New England Biolabs, Cat. Nr. 404-C); die Sequenzierung wurde unter Verwendung der 18-mers in Verbindung mit den USB Sequenase-materialien und Vorschriften durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.

15

Wie die Ergebnisse aus Fig. 6 anzeigen, sind die Sequenzierungsbandenmuster bei der Verwendung von Startern, die einem Methylamin/T-Butylamin-Reagenz und einer Acetyl-Schutzgruppe ausgesetzt waren, im wesentlichen identisch gegenüber Startern, die über Ammoniak und bz abgeleitet wurden.

20

## Beispiel XII: 3'-terminale Transferaseverlängerung

25

22-mers wurden unter Verwendung entweder einer Acetyl- oder bz-Schutzgruppe für Desoxycytidin synthetisiert, und einem Reagenz ausgesetzt, das Methylamin/T-Butylamin umfaßte, für 90 Minuten bei 65°C, bzw. Ammoniak für 4 Stunden bei 65°C. Die 22-mers hatten die folgende Sequenz:

30

22-mer

5'-TTC-TGC-CGT-ACC-GTT-CCT-GTC-T-3'

35 Die löslich gemachten Oligomere mit aufgehobenem Schutz wurden unter Verwendung des Sep Pak-DNA Reinigungsmaterialsatzes gereinigt. Diese gereinigten Oligomere wurden als Starter für 3'-terminale Transferaseverlängerungs-Studien verwendet.



2,5 OD<sub>260nm</sub> jedes Oligonukleotids wurden zu 150 µl entionisiertem Wasser hinzugefügt; 5 mg Thymidintriphosphat ('TTP'), (Sigma, Cat. Nr. T8635); 5 µl Terminal-Desoxynukleotidyl/5 Transferase ('TDT'), 15 U/µl (BRL, Cat. Nr. 8008SB) und 50 µl Nachlauf- bzw. Trailingpuffer. Die Mischung wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und das sich ergebende Material unter Verwendung einer Sept Pak C<sub>18</sub> Kartusche bzw. Cartridge wie folgt gereinigt: die Reaktionsmischung wurde 1:2 in 0,5 m Ammonium-

10 acetat verdünnt, auf die Kartusche aufgegeben, gefolgt von Waschen der Kartusche mit entionisiertem Wasser, und das Produkt wurde mit 60% Methanol in entionisiertem Wasser eluiert. Die Produkte wurden durch Kapillar-Elektrophorese analysiert; die Elektropherogramm-Ergebnisse sind in Fig. 7 und 8 dargestellt.

15

Die Elektropherogramme der Fig. 7 und 8 sagen aus, daß die Starter, die mit Acetyl geschütztes Cytidin umfaßten und einem Methylamin/T-Butylamin-Reagenz (Fig. 7) ausgesetzt waren, und Starter, die mit bz geschütztes Cytidin umfaßten, und

20 Ammoniak (Fig. 8) ausgesetzt waren, beide an ihren 3'-Enden verlängert wurden, und daß die sich ergebenden Produkte im wesentlichen identisch waren.

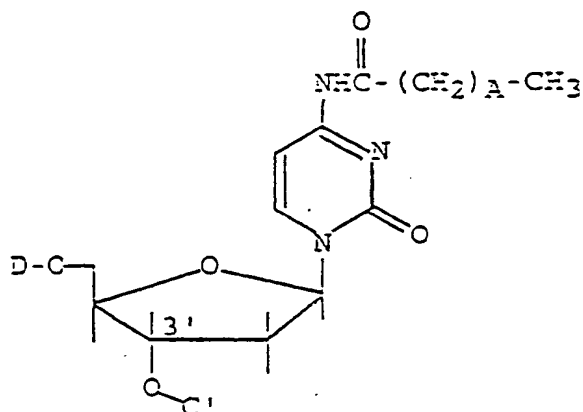
5

# P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verbindung, die die folgende Struktur aufweist:

10

15



20

wobei A eine ganze Zahl zwischen 0 und 9 ist; C' eine Phosphoramidit-Funktionalität ist; und D Wasserstoff oder eine Schutzgruppe ist, die bei der Oligonukleotid-Synthese verwendet wird.

25

2. Verbindung nach Anspruch 1, bei der A eine ganze Zahl zwischen 0 und 5 ist.

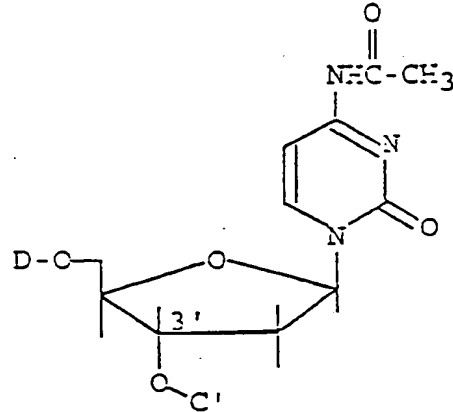
3. Verbindung nach Anspruch 1, bei der A eine ganze Zahl zwischen 0 und 2 ist.

30

4. Verbindung nach Anspruch 1, bei der A 0 ist.

35

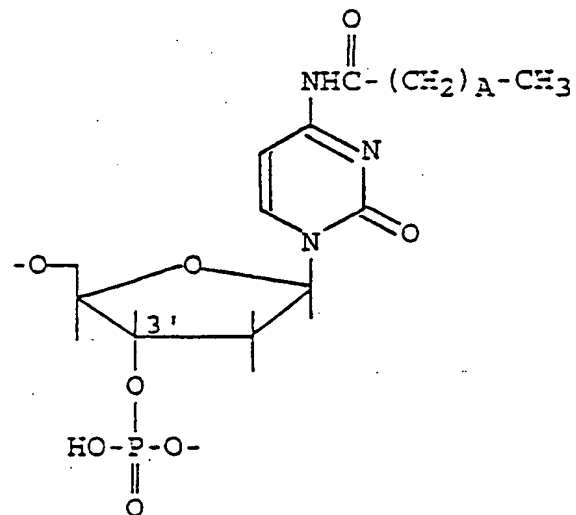
5. Verbindung, die die folgende Struktur aufweist:



wobei C' eine Phosphoramidit-Funktionalität ist;  
und D ausgewählt ist aus Wasserstoff, und einer Trityl-Schutzgruppe.

6. Verfahren zur Schutzaufhebung bei einem DNA-Molekül, das die Schritte umfaßt:

a) Bereitstellen eines Oligonukleotids, das zumindest ein Nukleotid umfaßt, das die folgende Formel aufweist:



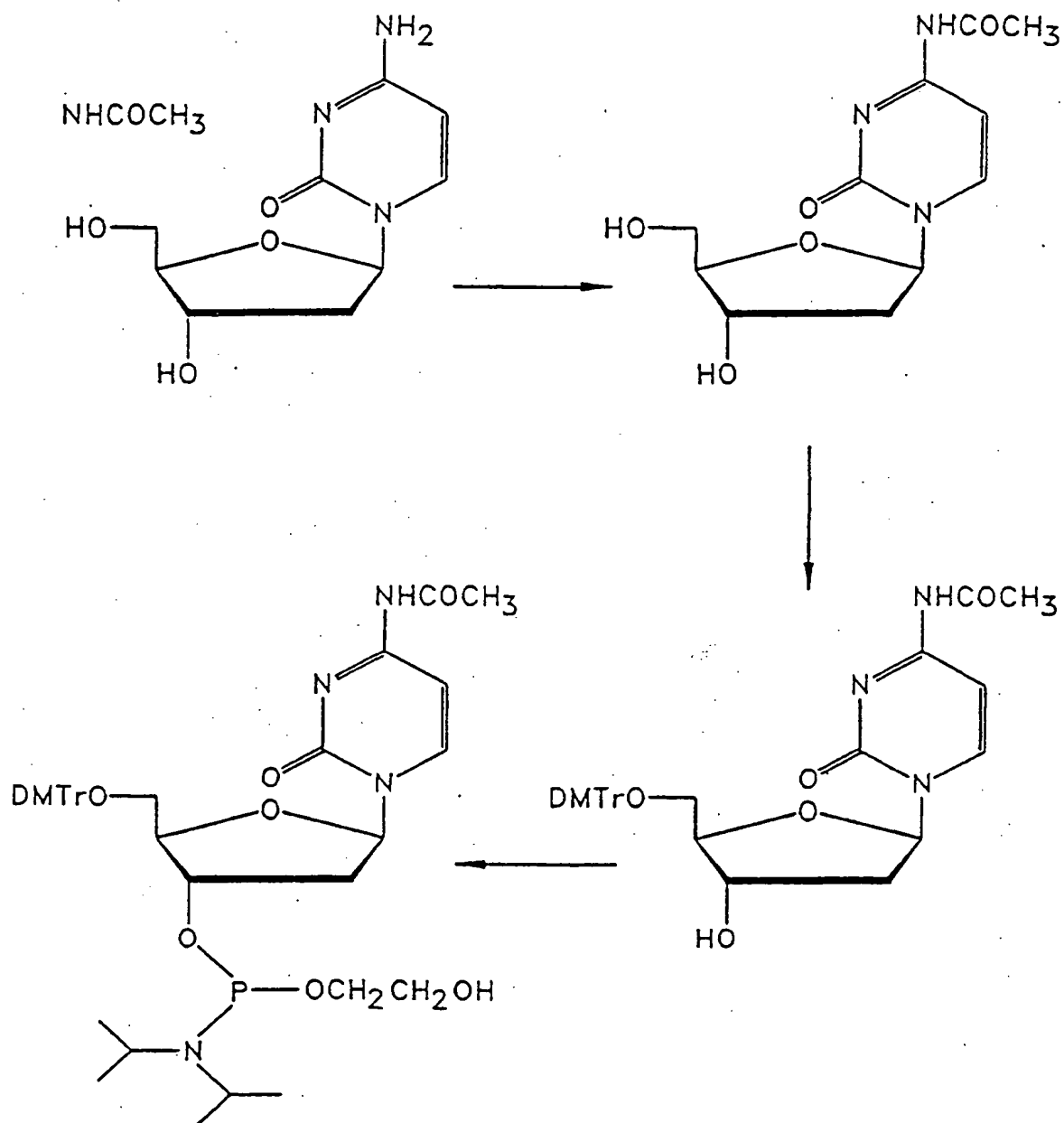
wobei A eine ganze Zahl zwischen 0 und 9 ist;  
und

b) In Kontakt bringen der genannten Verbindung mit einer Lösung, die ein geradkettiges Alkyl-Amin aufweist, um ein DNA-Molekül, bei dem der Schutz aufgehoben ist, zu bilden.

24.10.97

EP 0 637 314  
93 909 499.1

3/7

FIG. 1.

24.10.97

2/7

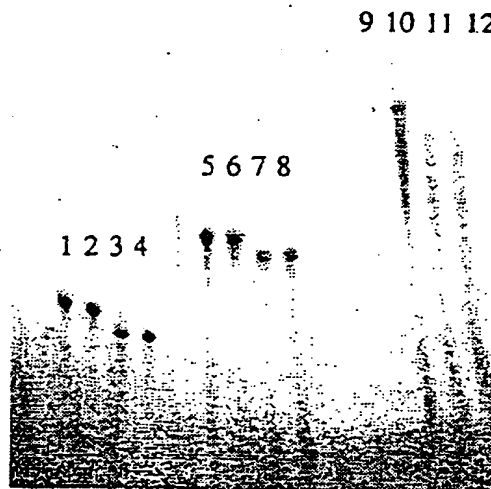


Fig. 2

21.10.97

3/7

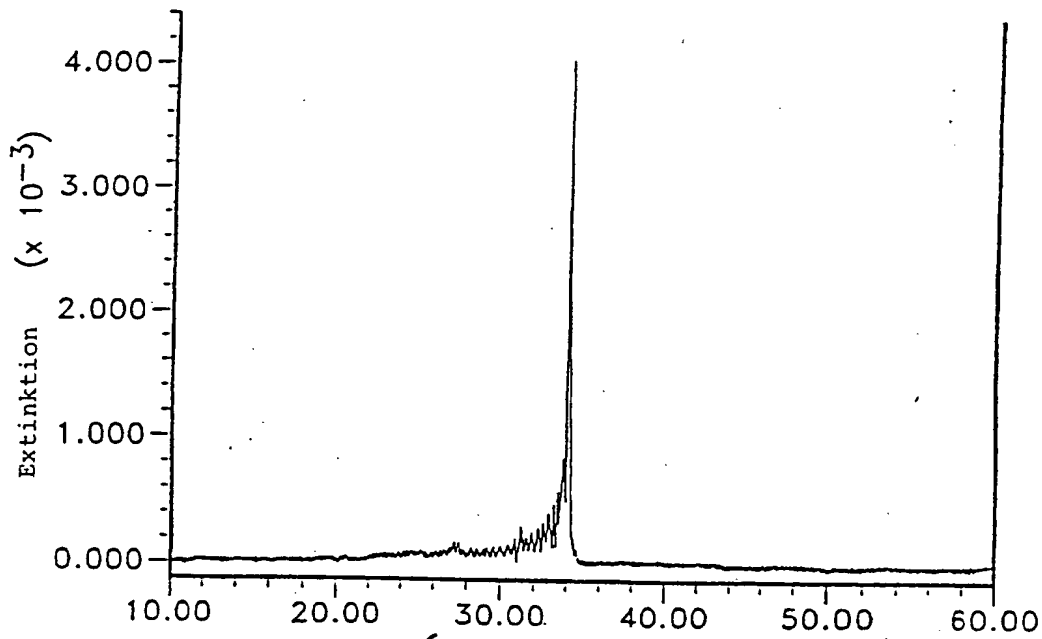


FIG. 3.

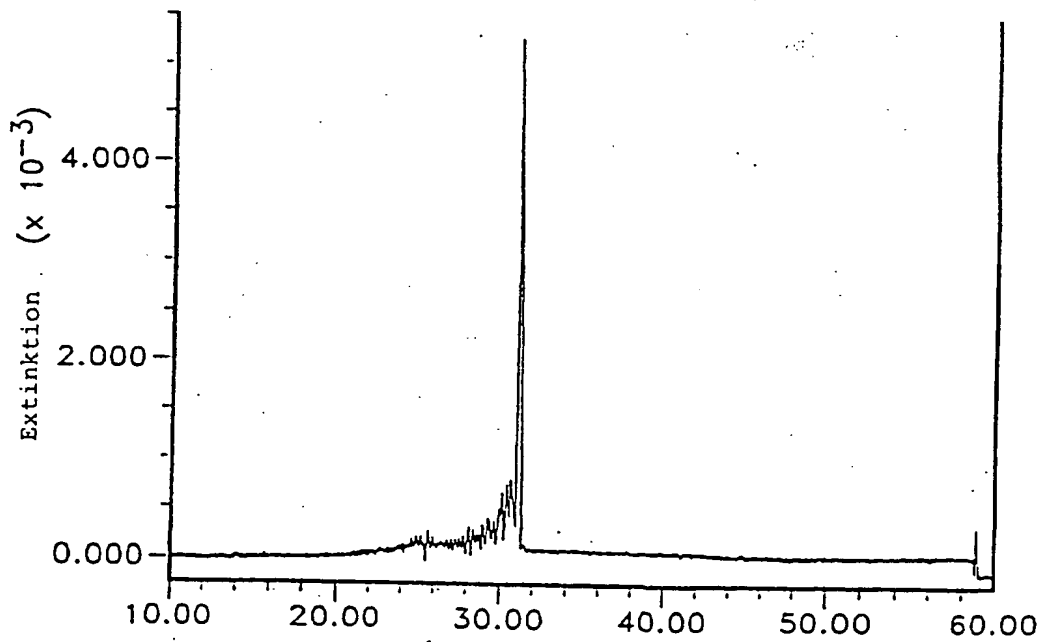
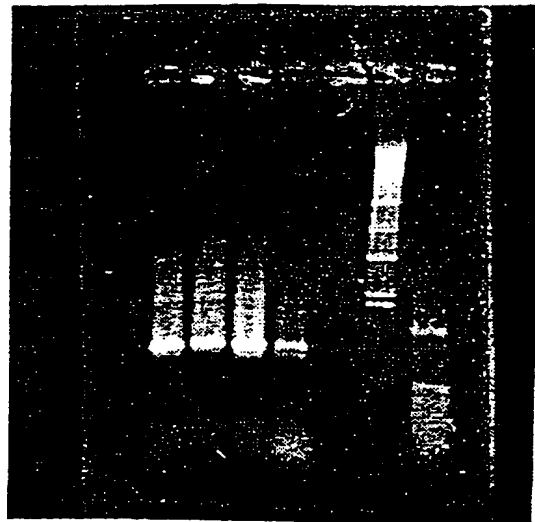


FIG. 4.

4/7

24.10.97

BEST AVAILABLE COPY



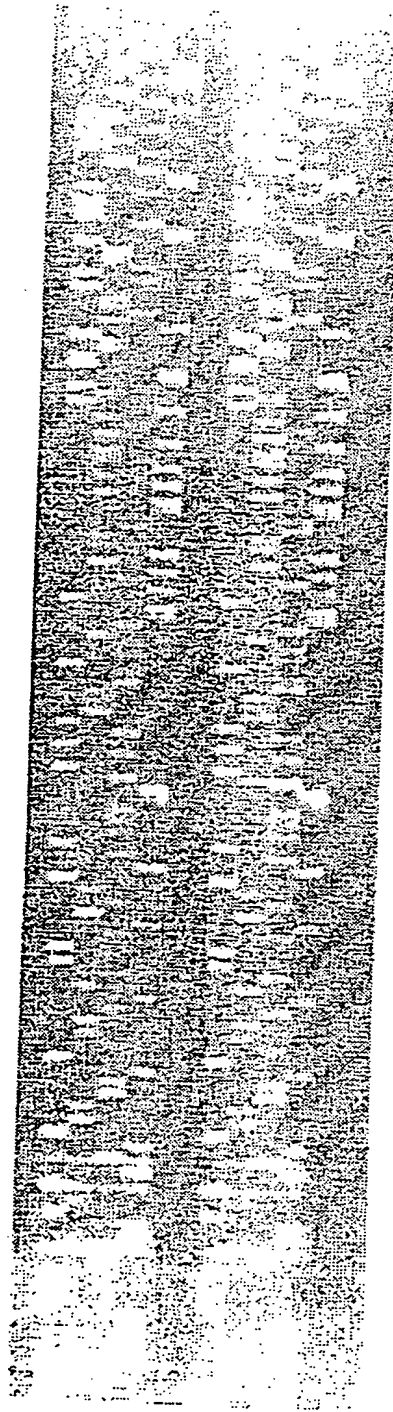
1 2 3 4

Fig. 5



517

2010-97



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 6

617

2.10.97

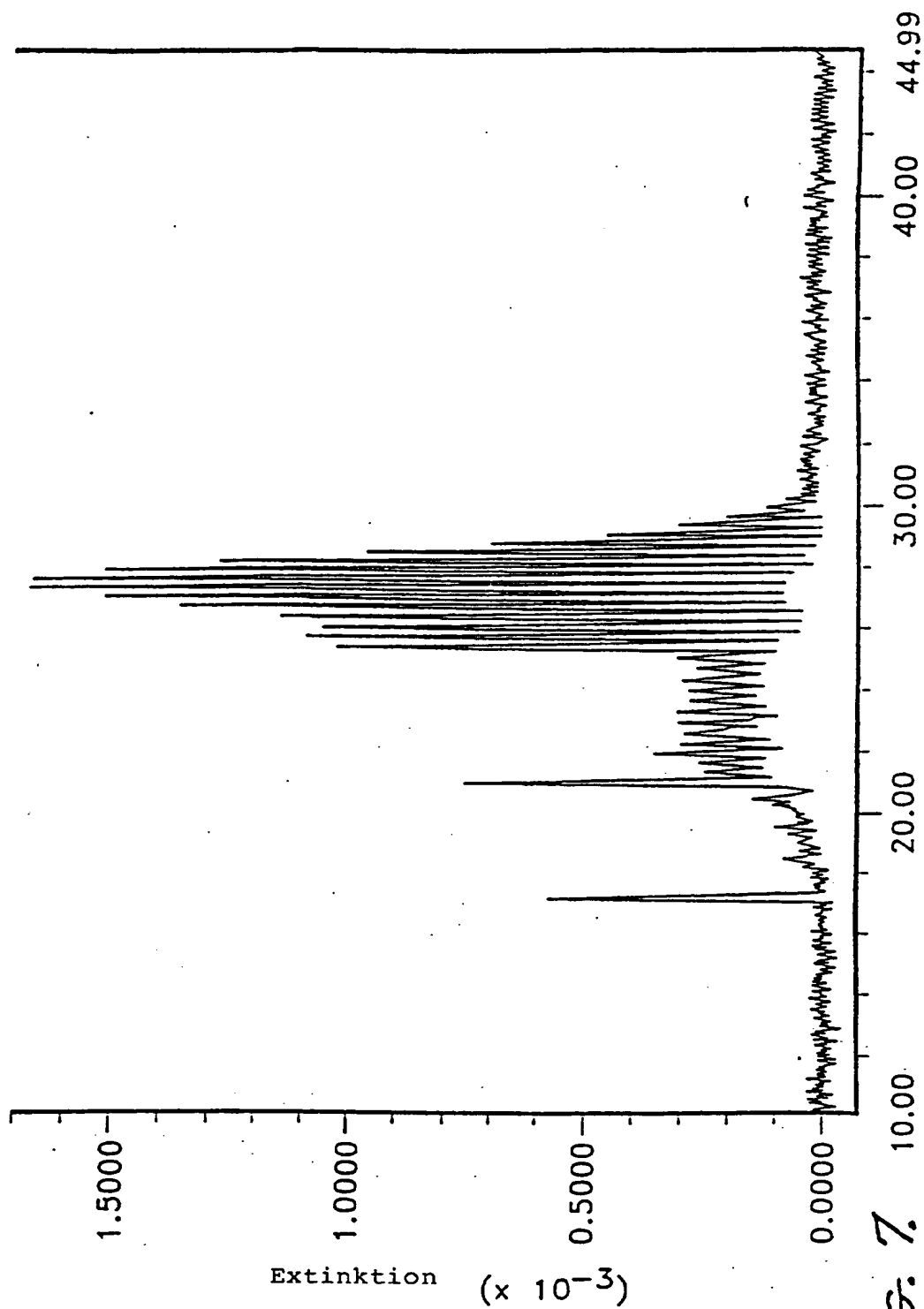


FIG. 7.

20.10.97

7/7

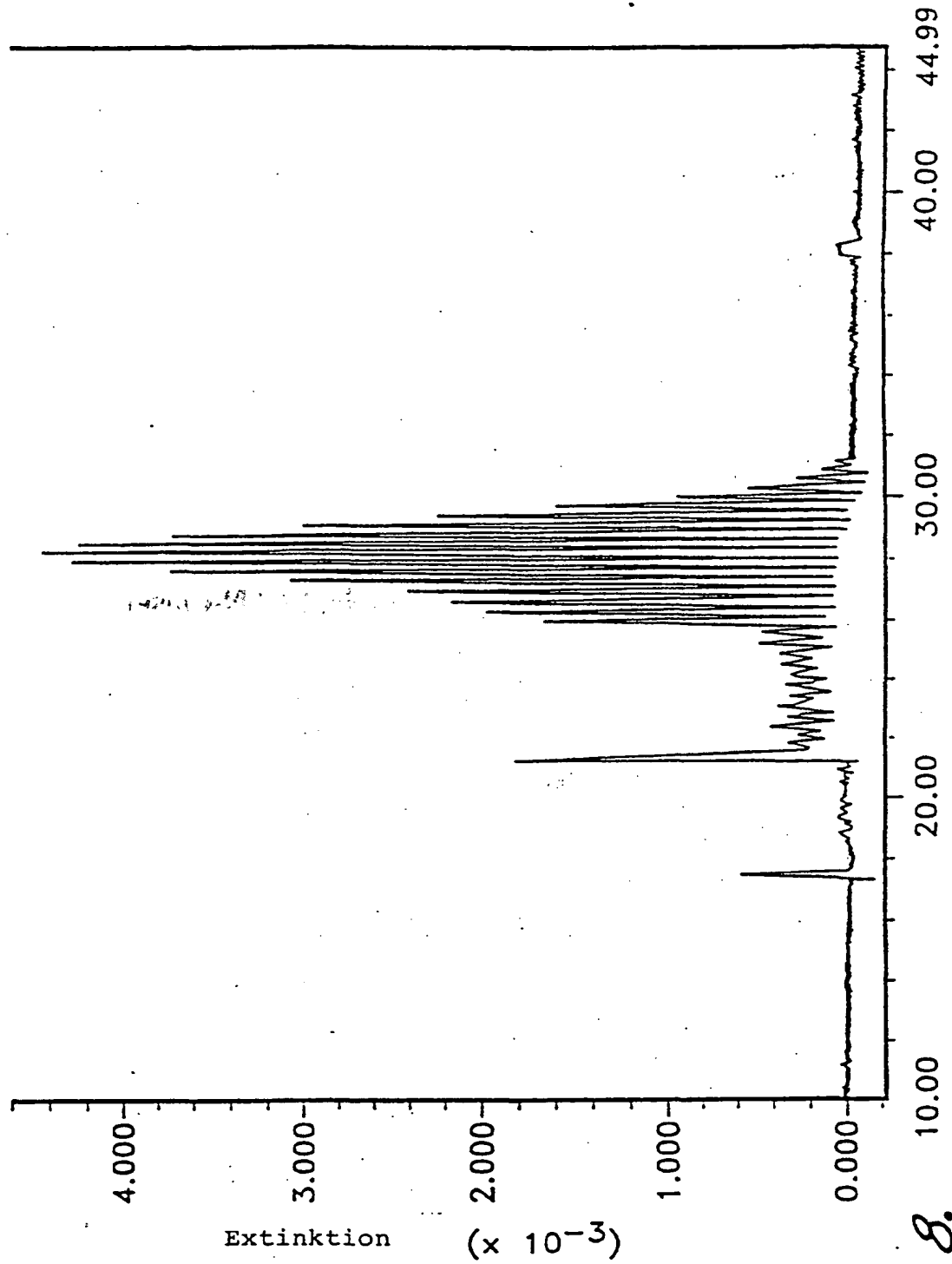


FIG. 8.

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**